(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 487 440**

(51) Int. CI.:

A23C 19/06 (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)
C12C 5/00 (2006.01)
A23L 1/317 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2005 E 05701230 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 1705998**

(54) Título: **Carboxipeptidasa para maduración del queso**

(30) Prioridad:

30.01.2004 EP 04075294

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.08.2014

(73) Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL

(72) Inventor/es:

VAN DIJK, ALBERTUS ALARD;
FOLKERTSMA, BAUKJE y
DEKKER, PETRUS JACOBUS THEODORUS

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Carboxipeptidasa para maduración del queso.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la maduración del queso.

Antecedentes de la invención

El sabor de los productos alimenticios es uno de los atributos fundamentales para el consumidor. En los productos fermentados, v.g. los productos lácteos, los sabores se obtienen a partir de los componentes de la leche por actividades enzimáticas de microorganismos. En el queso, por ejemplo, se han identificado como esenciales diversos compuestos de sabor, y muchos de ellos se derivan de la degradación de la caseína. Otros procesos enzimáticos, tales como la lipólisis, están implicados también, muy particularmente en quesos en los que están implicados hongos en el proceso de maduración, v.g. los quesos Camembert y Roquefort. Adicionalmente, la fermentación de la lactosa podría conducir a compuestos de sabor tales como ácido propiónico (Smit *et al.*, Food Res. Int. (2000) **33**, 153-160).

La proteólisis en el queso durante la maduración juega un papel vital en el desarrollo de textura así como de sabor, y ha sido objeto de varias revisiones (véase *v.g.*, McSweeney & Sousa, Lait (2000) **80**, 293-324). La proteólisis contribuye a cambios en la textura de la matriz del queso, debidos a descomposición de la red proteínica, disminución en a_w, por fijación de agua por los grupos carboxilo y amino liberados y aumento del pH, lo que facilita la liberación de compuestos que aportan sabor durante la masticación (Sousa et al., Int. Dairy Journal (2001), **11**, 327-345). Ello contribuye directamente al sabor normal y a sabor desagradable (v.g. amargor) del queso por la formación de péptidos y aminoácidos libres así como liberación de sustratos (aminoácidos) para cambios catabólicos secundarios, a saber transaminación, desaminación, descarboxilación, desulfuración, catabolismo de aminoácidos aromáticos y reacciones de aminoácidos con otros compuestos. La velocidad y el patrón de la proteólisis pueden verse influenciados por la localización en el interior del queso.

La maduración del queso es un proceso que requiere bastante tiempo, y que implica reacciones complejas y bien equilibradas entre glicólisis, proteólisis y lipólisis de los componentes de la leche. En la mayoría de los quesos, enzimas bacterianas juegan un papel importante en este proceso. Es bien sabido que el cambio del contenido de enzimas bacterianas en el queso afecta directamente a la velocidad de maduración del queso y su sabor final (Klein & Lortal, Int. Dairy Journal (1999) **9**, 751-762.). Una vía para influir en la maduración del queso consiste en aumentar el conjunto de enzimas bacterianas en la cuajada del queso por adición de bacterias de ácido láctico enteras, incapaces de crecer y producir niveles significativos de ácido láctico, pero que suministran todavía enzimas de maduración activas durante el envejecimiento del queso. Los iniciadores están debilitados normalmente y se hace referencia a ellos como atenuados.

Dado que la maduración del queso es un proceso que consume mucho tiempo, el miso es también costoso. Los quesos precisan almacenarse durante la maduración en condiciones precisamente definidas de temperatura y humedad durante semanas hasta meses. El tiempo de maduración varía considerablemente entre los diversos quesos, desde 3 semanas (*v.g.* Mozzarella) a más de 2 años (*v.g.* Parmesano, y Cheddar extra-maduro). Cualquier proceso que pudiera dar como resultado la aceleración de la maduración del queso es interesante desde un punto de vista económico: la misma cantidad de queso puede producirse en un intervalo de tiempo más corto.

La proteólisis en el queso es un proceso muy complejo, y están implicadas proteasas de diversos orígenes (para revisión véase, v.g. Fox & McSweeney, Food Rev. Int. (1996) **12**, 457-509). Tales proteasas son el coagulante que se utilizó durante la fabricación del queso (v.g. quimosina, pepsina o proteinasas de ácido fúngico), proteínas propias de la leche (v.g. plasmina), las proteasas proporcionadas por las bacterias iniciadoras, proteasas de microflora adventicia no iniciadora, proteasas de un segundo inóculo (en algunas variedades, *v.g. P. roqueforti, P. camemberti, Br. Linens*), células bacterianas atenuadas y proteasas exógenas. Las células atenuadas y las proteasas exógenas son herramientas recientes en el desarrollo de la aceleración de la maduración del queso. La generación de aminoácidos libres es un paso importante en la aceleración de la maduración del queso. Aunque los aminoácidos libres contribuyen al sabor global del queso, su contribución es relativamente pequeña. Los aminoácidos son los precursores, que son convertidos subsiguientemente por los microorganismos que están presentes en el queso para dar sabor a los compuestos. La disponibilidad de aminoácidos es por tanto importante para la formación del sabor del queso y por consiguiente para la maduración del queso.

La alternativa principal al uso de queso natural en productos alimenticios procesados para el consumidor que requieren un sabor de queso son concentrados con sabor de queso de alta intensidad tales como el queso modificado con enzimas (EMCs), polvos de queso y sabores de queso (Kilcawley, Wilkinson & Fox, Int. Dairy Journal (1998), 8, 1-10). Los sabores de queso no se producen para uso en queso como tal, sino que se producen para ser aplicados en otros alimentos que contienen convencionalmente queso natural. El queso se añade adicionalmente a los productos como una preparación secada por pulverización para mejora del sabor, aspecto y textura. La cantidad de queso utilizado varía, y el sabor y la calidad globales del producto dependen del tipo de queso utilizado. El queso que se ha

tratado enzimáticamente para mejorar el sabor o una porción significativa del perfil de dicho queso se considera que es un EMC y el mismo proporciona al fabricante de alimentos una nota intensa de queso en una forma que es eficaz en costes, nutritiva y natural (Kilcawley, Wilkinson & Fox, Int. Dairy Journal (1998), 8, 1-10). Los EMCs tienen un perfil de sabor que puede ser totalmente diferente del de un queso natural, y sin embargo, al diluirlos con una base suave o cuasi-suave adecuada, proporcionan la nota de sabor a queso en el producto final. La base de la tecnología EMC es el uso de enzimas específicas para producir sabores típicos de queso a partir de sustratos adecuados. Las proteasas, término que incluye tanto endo-proteasas como exo-proteasas, son enzimas importantes en la producción de EMC. Su papel es similar al que desempeñan en la maduración del queso. La proteólisis en EMC es extensa y produce a la vez niveles altos de notas sabrosas y amargas; las últimas pueden prevenirse, eliminarse o enmascararse por proteólisis controlada, adición de exopeptidasas específicas o inclusión de agentes enmascaradores, v.g. queso maduro o glutamato monosódico (Wilkinson & Kilcawley, Bulletin of the IDF (2002), 371, 10-15).

Muchas proteasas están implicadas en la generación de sabores de queso. La generación del sabor apropiado para un queso (o producto derivado de queso, como EMC) requiere un equilibrio delicado de actividades proteolíticas debidas a las proteasas implicadas. Cualquier desequilibrio conducirá fácilmente a sabores que no se desean, tales como desarrollo de amargor. Especialmente, el desarrollo de amargor en el queso (o EMC) ha sido bien descrito y documentado (véase v.g. LeMieux & Simard, Lait (1991) 71, 599-636; LeMieux & Simard, Lait (1992) 72, 335-382). El desarrollo de proteasas para queso o EMC a fin de mejorar los procesos de maduración es por tanto un proceso muy delicado y complicado. Se prefieren las exoproteasas a las endoproteasas debido a que aquéllas tienen una tendencia menor a inducir formación de amargor. Es sabido que las endo-proteasas introducen fácilmente dicho amargor y por esta razón no se utilizan preferentemente. Una revisión de productos comerciales disponibles se proporciona en diversos artículos (Wilkinson, van den Berg & Law, Bulletin of the IDF (2002) 371, 16-19; Kilcawley, Wilkinson & Fox, Food Biotechnol (2002) 16, 29-55; Kilcawley, Wilkinson & Fox, Enzyme Microb. Technol. (2002) 31, 310-320). Ejemplos incluyen preparaciones de enzimas derivadas de especies fúngicas (que incluyen, pero sin carácter limitante, Bioproteasa P Conc y Bioproteasa A conc de Quest, Países Bajos, Proteasa M, Proteasa A y Proteasa ácida A de Amano, Promod 215 de Biocatalysts, Sternzyme B5026 de Stem, Flavourzyme MG/A de Novozymes, Dinamarca) y especies bacterianas (que incluyen, pero sin carácter limitante, Protamex y Neutrase de Novozymes, Dinamarca, Proteasa N de Amano, Promod 24P y 24L de Biocatalysts, Proteasa B500 de DSM, Países Bajos, **y** Proteasa 200L de Rhodia Foods, Francia). Las proteasas varían considerablemente en composición con respecto a la presencia de proteasas específicas y/o la ratio en la que existen estas proteasas en un producto específico. Los documentos de Kilcawley, Wilkinson y Fox, a los que se ha hecho referencia arriba, demuestran claramente que la mayoría de los productos de proteasa comerciales son una mezcla de actividades de endo- y exo-peptidasas. Han sido desarrollados varios productos que contienen únicamente actividad de exo-peptidasa. Para aplicaciones alimentarias, éstas son invariablemente amino-peptidasas, y ejemplos incluyen DBS50 y DBP20 (de Rhodia, Francia), Corolase LAP (de Rohm, Alemania), Flavourzyme MG/A (de Novozymes, Dinamarca), Accellerzyme AP (de DSM, Países Bajos) y Peptidase R (de Amano, Japón). Las amino-peptidasas se desarrollan y seleccionan para la liberación de aminoácidos que son precursores importantes de sabor de queso tales como leucina, fenilalanina y valina. Varias solicitudes de patente (v.g. WO 96/38549) describen la preparación y el uso de amino-peptidasas, exentas de endo-proteasas, que pueden utilizarse para acelerar la maduración del queso. Aunque existe una descripción del uso de una sola carbo-peptidasa de queso para reducir el amargor de los péptidos amargos procedentes de péptidos de la caseína de la leche (Umetsu, Matsuoka & Ichishima, J. Agric. Food Chem (1983) 31, 50-53), no se hace descripción alguna del uso de una preparación de proteasa que contenga una sola actividad de carboxipeptidasa que ha sido útil para la aceleración de la maduración del queso. Preparaciones de proteasas comerciales que contienen actividad de carboxipeptidasa son conocidas (v.g. FlavorPro 192, de Biocatalysts), pero éstas contienen siempre mezclas de aminopeptidasa, endo-proteasa y posiblemente otras actividades de proteasas además de la actividad de carboxipeptidasa.

La adición de proteasas para maduración del queso puede hacerse en diversas etapas de la preparación del queso. Preferiblemente, las enzimas se añaden a la leche del queso antes de o junto con la adición del coagulante (v.g. quimosina). La adición en este punto asegura una distribución homogénea de las enzimas en todo el queso. Alternativamente, las enzimas pueden añadirse en una etapa posterior, v.g. durante la etapa de salado en la fabricación de Cheddar, pero esto introduce el riesgo de una distribución no homogénea de las enzimas en el queso y la formación de los denominados puntos calientes. Por dicha razón, se prefiere la adición de las enzimas a la leche del queso. Una desventaja es que la mayor parte de la enzima (60-90%) a menudo no se incorpora en la cuajada del queso, y se desecha en la fracción de suero en donde aquella puede dar lugar a proteólisis (indeseada) que hace el suero menos adecuado o inadecuado para aplicaciones ulteriores. Especialmente las endo-proteasas con actividad importante a pH 5-7 podrían causar tales actividades secundarias indeseables, pero también amino-peptidasas que tienen a menudo actividad óptima en este intervalo de pH pueden dar lugar a la formación de, v.g. sabores indeseables. Otro posible problema de, especialmente, la adición de endo-proteasas a la leche del queso es que las mismas interfieren con el proceso de coagulación, dando lugar a una hidrólisis específica que conduce a reducción del rendimiento en queso. Asimismo, las amino-peptidasas pueden causar pérdidas de rendimiento debido a que usualmente son muy activas a pH 6-7, el intervalo usual de pH de la fabricación del queso. Se prefieren las proteasas que no son activas o no son prácticamente activas a los valores de pH durante la fabricación del queso, pero que se vuelven activas en el queso, debido a que las mismas no interferirán con los procesos de fabricación del queso y no causaran reacciones indeseables en el suero.

Blinkovsky A.M et al. (1999), Applied and Environmental Microbiology, vol.65, No.8, p.3298 - 3303 da a conocer una carboxipeptidasa-I de A. oryzae.

Descripción de la Invención

De acuerdo con la presente invención, puede lograrse una maduración acelerada del queso por el uso de una carboxipeptidasa I de Aspergillus niger. La preparación de carboxipeptidasa debería estar exenta de actividad de endo-proteasa, y debería ser capaz de liberar al menos aminoácidos que son importantes para la formación de sabores del queso, tales como leucina, fenilalanina, valina y metionina. La carboxipeptidasa se añade a niveles de actividad entre 1 y 2500 CPG/g sustrato (v.g., leche del queso), preferiblemente 1-250 CPG/g sustrato o más preferiblemente 1-25 CPG/g sustrato. Las unidades CPG se definen en el Ejemplo 1. La actividad de las proteasas se mide por la hidrólisis de una caseína (solución de ensayo con 6 g/l), a pH 6,0, 4ºC durante 1 hora. 1 PU es la cantidad de enzima que produce, en 1 minuto, un hidrolizado (soluble en TCA), cuya absorbancia (a 280 nm) es igual a una solución de tirosina de 1 µM). La preparación de carboxipeptidasa se define como exenta de actividad de endo-proteasa cuando la ratio de actividad de endo-proteasa (PU)/actividad de carboxipeptidasa (CPG) en la preparación es menor que 0,01, preferiblemente menor que 0,001 y muy preferiblemente menor que 0,0005. La carboxipeptidasa es una carboxipeptidasa de amplio espectro de Aspergillus niger que es capaz de liberar la mayor parte de los aminoácidos naturales de los péptidos o proteínas. La carboxipeptidasa de amplio espectro se define como una enzima que es capaz de liberar al menos 80% de los aminoácidos naturales en cantidades detectables por el método que se describe en el Ejemplo 3 de esta solicitud. Preferiblemente, la preparación de carboxipeptidasas contiene una carboxipeptidasa I de Aspergillus niger en la cual el 90% de la actividad de carboxipeptidasas está causada por una enzima simple, medida como se describe en el Ejemplo 1, pero están comprendidas también combinaciones de carboxipeptidasas.

Sorprendentemente, se ha encontrado que el uso de una carboxipeptidasa purificada CPD I (PEPG) de *Aspergillus niger* es perfectamente capaz por sí misma de acelerar la maduración del queso. La enzima ha sido descrita (Dal Degan, Ribadeau-dumas & Breddam, Appl. Environ. Microbiol (1992) 58, 2144-2152) y secuenciada (Svendsen & Dal Degan, Bioch. Biophys. Acta (1998) 1387, 369-377). La carboxipeptidasa I puede utilizarse también para acelerar el desarrollo de sabor de queso en EMCs. Otras aplicaciones preferidas de la carboxipeptidasa I se encuentran en el campo del desarrollo de sabores en alimentos fermentados como salchichas y cervezas fermentadas en las cuales, análogamente a la situación en el queso, se sabe que son particularmente importantes la disponibilidad de aminoácidos libres como valina, leucina, isoleucina y fenilalanina así como de aminoácidos que contienen azufre como la metionina.

Leyendas de la Figura

La Figura 1 muestra el perfil de actividad en relación con el pH.

Ejemplo 1

Clonación de CPD-I (PEPG)

La secuencia de aminoácidos de carboxipeptidasa I (PEPG) de A. niger ha sido descrita (Svendsen & DalDegan, Bioch. Biophys. Acta (1998) 1387, 369-377). Se diseñaron cebadores de PCR degenerados para clonar el gen pepG a partir de una biblioteca genómica de Aspergillus niger N400 (CBS 120.49), utilizando métodos conocidos por las personas expertas en la técnica. El gen se fusionó al extremo 3' del promotor glucoamilasa. Ejemplos análogos de fusiones de genes estructurales al promotor de glucoamilasa han sido descritos (EP-A-0420358, EP-A-0 463706 y WO99/38956). En primer lugar, el gen estructural pepG se amplificó por PCR a partir de un fragmento genómico que contenía el gen y se purificó. En segundo lugar, se amplificó por PCR la región promotora del gen glaA utilizando, en el extremo 3', un cebador que solapa el extremo 5' del gen estructural pepG. En tercer lugar, los dos fragmentos PCR se fusionaron por PCR de fusión con un cebador oligonucleotídico 5' del promotor glaA, y un oligonucleótido que solapaba el codón de parada de pepG en la dirección inversa. En cuarto lugar, el fragmento de fusión resultante se clonó en el vector de expresión de *A. niger* pGBTOP7 (WO 99/38956), dando como resultado un plásmido de fusión que contenía el promotor glaA, el gen estructural pepG y el terminador glaA. Este plásmido se digirió con HindIII y se co-transformó con pGBBAAS-1 digerido con XhoI en *Aspergillus niger* ISO502, esencialmente como se describe en WO 99/38956. Los transformantes seleccionados para crecimiento en placas de acetamida se analizaron utilizando PCR de colonias para comprobar la presencia de la casete de expresión pepG, utilizando técnicas conocidas. Se determinó la secuencia del gen. Los transformantes de pepG de *A. niger* se cultivaron en un matraz de sacudidas utilizando métodos que se han descrito previamente (WO 99/38956). Después de crecimiento durante 6 días a 34ºC, se analizaron los sobrenadantes respecto a actividad. La actividad de PEPG se determinó por adición de 10 µl del sobrenadante de cultivo a 990 µl de una solución que contenía acetato de Na 45 mM (pH 4,5), EDTA 0,95 mM y FA-Phe-Ala 0,2 mM (obtenido de Bachem). Se siguió el cambio en densidad óptica a 337 nm. La disminución en densidad óptica es una medida de la actividad de PEPG. Una unidad de enzima (1 CPG) se define como la cantidad de enzima necesaria para disminuir la densidad óptica a 337 nm en 1 unidad de absorbancia por

minuto en las condiciones del test. El transformante que exhibía el mayor valor de CPG por ml se seleccionó para la expresión de PEPG.

Ejemplo 2

Purificación de PEPG

Se purificó PEPG a partir del caldo de cultivo de *Aspergillus niger* que expresaba la enzima de acuerdo con el método descrito (Dal Degan, Ribadeau-Dumas & Breddam, Appl. Environ. Microbiol (1992) 58, 2144-2152) con la excepción de que se omitió el paso de CABS-Sepharose. La actividad de la enzima final sustancialmente purificada se estableció como 150 CPG/ml, utilizando la medida de actividad como se describe en el Ejemplo 1. La actividad de endo-proteasa era inferior a los límites de detección (< 0,6 PU/ml). La producción y purificación de PEPG se repitieron dando como resultado una preparación final que contenía 650 CPG/ml de actividad de carboxipeptidasa y 2,25 PU/ml de actividad de endo-proteasa. La ratio PU/CPG para la última preparación era 0,003.

Ejemplo 3

Determinación de la especificidad del sustrato de PEPG

La especificidad de sustrato de la PEPG purificada se determinó utilizando sustratos Z-Ala-X, en los cuales Z es benciloxicarbonilo y X es cualquiera de los aminoácidos (código de una sola letra) A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y. Todos los sustratos se obtuvieron de Bachem, excepto cuando X = Q o T, sustratos que se obtuvieron de PEPSCAN (Países Bajos). La especificidad de enzima se determinó a pH 4,0 y 40ºC en soluciones que contenían 3 mM de los sustratos peptídicos. La reacción se inició por adición de la solución de enzima de 5 µl (440 unidades/ml) a 95 µl de las mezclas de reacción. Se tomaron muestras para cada sustrato inmediatamente al cabo de t = 0 minutos y se aplicaron sobre placas TLC (Merck HPTLC (placas 20 X10, gel de sílice 60), tomándose otra muestra al cabo de 45 minutos de incubación que se aplicó también sobre la misma placa TLC. Como control, se extendieron las soluciones sustrato sin la enzima sobre la misma placa de TLC. La placa se tiñó respecto a grupos amino por pulverización con un spray de ninhidrina (ACROS). La actividad enzimática se evaluó desde - (sin afinidad) a +/- (actividad baja), a + (poca actividad) a +++++ (actividad muy alta). La actividad muy alta (+++++) sobre un sustrato particular se registra cuando todo el sustrato se ha convertido ya en la muestra t = 0. Los resultados son como sigue:

X	Registro de actividad	Ref	X	Registro de actividad	Ref
A	++	490	M	+++++	5820
C	nt	nt	N	+	nt
D	+	160	P	+/-	3
E	++	nt	Q	++	41
F	++++	nt	R	++	130
G	+	5	S	++	70
H	+	10	T	++	nt
I	++++	7090	V	+++++	3380
K	+++	200	W	+	nt
L	+++++	2950	Y	+++	nt

nt: no testado. Ref: datos extraídos de Dal Degan, Ribadeau-dumas & Breddam, Appl. Environ. Microbiol (1992) 58, 2144-2152. Los números indican valores de kcat/kM en min^{-1} mM^{-1}.

La tabla muestra que la PEPG clonada y purificada es similar al descrito por Dal Degan en 1992, pero existen algunas diferencias inesperadas. La enzima libera preferentemente los aminoácidos hidrófobos F, I, L, M, y V. La preferencia del gen clonado es, sin embargo, diferente de la descrita por Dal Degan *et al*. que tiene preferencia máxima para I, mientras que la enzima clonada muestra actividad máxima en L, M, y V. Asimismo, la enzima purificada es bastante activa sobre K, más activa que v.g. sobre A y D, que es diferente de los datos descritos por Dal Degan *et al*. Evidentemente, la carboxipeptidasa tiene una especificidad de sustrato muy amplia y es capaz de manipular todos los aminoácidos excepto posiblemente C, que no se testó.

Ejemplo 4

Demostración de maduración acelerada del queso de PEPG en mini-queso (tipo Cheddar)

Se produjeron quesos en miniatura como se describe por Shakeel-Ur-Rehman et al. (Protocolo para la fabricación de quesos en miniatura en **Lait**, 78 (1998), 607-620). Se pasteurizó leche bruta de vaca por calentamiento durante 30 minutos a 63ºC. La leche pasteurizada se transfirió a botellas de centrífuga de plástico con boca ancha (200 ml por botella) y se enfrió a 31ºC. Subsiguientemente, se añadieron a cada una de los 200 ml de leche pasteurizada en las botellas de centrífuga 0,72 ml de cultivo iniciador DS 5LT1 (DSM Gist B.V. Delft, Países Bajos) y se maduró la leche durante 20 minutos. A continuación, se añadió $CaCl_2$ (132 µl de una solución de 1 $mol.l^{-1}$ x 200 ml de leche madurada, seguido por adición del coagulante (0,04 IMCU por ml). En caso de que el experimento implicaba el uso de PEPG, se añadió esta enzima junto con el coagulante. Las soluciones de leche se mantuvieron durante 40-50 minutos a 31ºC hasta que se formó un coágulo. Se cortó manualmente el coágulo mediante cuters de alambre estirado, separados a una distancia de 1 cm en un bastidor. Se permitió el curado durante 2 minutos seguido por agitación moderada durante 10 minutos. Después de ello, se aumentó gradualmente la temperatura a 39ºC durante 30 minutos bajo agitación continua de la mezcla cuajada/suero. Después de alcanzar un pH de 6,2, las mezclas cuajada/suero se centrifugaron a la temperatura ambiente durante 60 min a 1700 *g*. Se escurrió el suero y las cuajadas se mantuvieron en un baño de agua a 36ºC. Los quesos se invirtieron cada 15 minutos hasta que el pH hubo descendido a 5,2-5,3 y se centrifugaron luego a la temperatura ambiente a 1700 g durante 20 minutos. Después de la fabricación, los quesos se maduraron a 12ºC y se realizó un análisis sensorial después de 3 y 6 semanas de maduración por un panel de 3 personas como mínimo.

Se utilizaron varias dosis de PEPG con respecto a leche de queso. 0 (= control), 5, 50 y 500 CPG/200 ml de leche de queso. La adición de PEPG conducía claramente a un aumento global de la intensidad de sabor, conduciendo a un sabor más curado en comparación con el queso de control. Esto ocurría para todos los niveles de adición de PEPG, aunque el nivel mínimo de adición (5 CPG/200 ml) requería 6 semanas de maduración para producir un efecto claro. A las otras dosis (50 y 500 CPG/ml), el efecto sobre el sabor es ya obvio al cabo de 3 semanas de maduración. Los resultados demostraban claramente que PEPG acelera el desarrollo del sabor de queso, que el efecto era dependiente de la dosis, y que no se había desarrollado sabor desagradable alguno.

Ejemplo 5

Demostración de maduración acelerada del queso de PEPG en queso tipo Gouda

Se prepararon quesos Gouda en tinas de 200 l utilizando el cultivo iniciador DelvoTec® DX31D (obtenido de DSM) y Maxiren600 (obtenido de DSM; 55 IMCU/l de leche; DSM) como el coagulante, utilizando un protocolo estándar de fabricación de queso Gouda conocido por las personas expertas en la técnica. Se estandarizó leche bruta a una ratio de caseína a grasa de aproximadamente 0,9 y se pasteurizó durante 15 segundos a 72ºC. Se añadió PEPG inmediatamente antes de la adición de Maxiren a un nivel de 25 CPG/l. Se preparó un queso de control a partir del mismo lote de leche utilizando el mismo proceso de fabricación pero sin adición de PEPG. Después de coagulación, se cortó la cuajada y se agitó durante 20 minutos a baja velocidad. Después de esto, la mitad del suero se reemplazó con agua templada (40% del volumen inicial) para aumentar la temperatura desde 31ºC a 36ºC. Después de esto, se agitó la mezcla cuajada/suero a velocidad creciente, durante 30-40 minutos más hasta que la cuajada había alcanzado una solidez suficiente para el escurrido. Se cercó la mezcla cuajada/suero y se dejó durante media hora antes de ponerla en moldes de 5 kg. Se prensaron los quesos, utilizando presión creciente, durante aproximadamente 4 horas, después de lo cual se dejaron los quesos en reposo durante una noche. A la mañana siguiente, se pusieron en salmuera durante 24 horas. Después de dejar que los quesos se secaran, se aplicó un recubrimiento protector sobre el queso y los quesos iniciaron su periodo de maduración. Durante este periodo, se mantuvieron los mismos a 15ºC, con humedad relativa aproximada de 80%. Los quesos se dieron la vuelta regularmente y se recubrieron durante el periodo de maduración. Los quesos se evaluaron organolépticamente después de 6 semanas y 3 meses de maduración utilizando un panel cualificado constituido por un número mínimo de 8 personas. Después de 6 semanas, el queso que contenía PEPG obtuvo registros de suavidad significativamente más altos en comparación con el queso de control. Después de 3 meses de maduración, el queso que contenía PEPG era claramente diferente del queso de control, exhibiendo un sabor significativamente mejor (así como cremosidad claramente diferente). El sabor a queso del queso que contenía PEPG era agradable y más maduro, comparado con el queso de control. El experimento demostró claramente que PEPG acelera el desarrollo de sabor del queso y que no se desarrollaban en absoluto sabores desagradables.

Ejemplo 6

Demostración del perfil de pH de PEPG

La reacción enzimática se determinó en tampones de pH diverso. El tampón de pH 2, 3 y 4 contenía fosfato de sodio 0,1 M, ácido cítrico 0,05 M y ácido acético 0,05 M; el tampón de pH 4, 5 y 6 contenía fosfato de sodio 0,05 M, ácido acético 0,05 M y Tris 0,05 M. Se ajustó el pH al valor correcto utilizando HCl 4 M o NaOH 4 M. la solución del sustrato contenía FA-Phe-Ala 8 mM en metanol. La solución de ensayo contenía 965 µl de tampón, 25 µl de solución sustrato y 10 µl de enzima purificada. Las reacciones se llevaron a cabo a 25ºC, y el cambio de absorción a 337 nm se siguió durante 10 minutos. La actividad relativa se calculó a partir del cambio de absorbancia. Los resultados son

el valor medio de dos medidas separadas, excepto para la medida a pH 4, que se realizó por duplicado en dos tampones diferentes. Los resultados se dan en la Figura 1.

El perfil demuestra en la Figura 1 que la enzima tenía un pH óptimo de pH 4. El valor óptimo es claramente mayor que el óptimo de pH de 3,1-3,4 para la carboxipeptidasa descrita por Dal Degan (Dal Degan, Ribadeau-dumas & Breddam, Appl. Environ. Microbiol (1992) 58, 2144-2152 y las referencias citadas en dicho lugar).

Ejemplo 7

Uso de carboxipeptidasa para preparación de queso modificado con enzima

Se preparó una pasta de queso a partir de una mezcla de 90% de queso Gouda con 5 semanas de vejez y 10% de queso Gouda viejo, básicamente como ha sido descrito por Smit et al. (1995). Modelo Ch-easy: un modelo basado en queso para estudiar la maduración del queso. En P. Etievant, *Bioflavours*. (pp. 185-190).

Preparación de EMC utilizando carboxipeptidasa.

Se compró queso Gouda joven (de aproximadamente 6 semanas de vejez) de un supermercado local, y se ralló finamente. Se añadió agua MiliQ al queso rallado hasta alcanzar un contenido final de agua de aproximadamente 50% y, después de mezclar, se dividió la pasta de queso en porciones de 200 gramos en recipientes separados. La mezcla se calentó durante 5 minutos a 80ºC para eliminar el crecimiento microbiano. Se analizó uno de los recipientes para comprobar la eliminación del crecimiento microbiano por análisis de recuento de placas para bacterias, levaduras y mohos. Los otros recipientes se guardaron a 4ºC para uso posterior. Cuando se confirmó la ausencia de crecimiento microbiano por el análisis de recuento de placas, se utilizaron las pastas de queso preparadas en los recipientes restantes.

Antes de realizar las adiciones, la pasta de queso se calentó a 55ºC y se enfrió suavemente a 30ºC. Se prepararon soluciones de PEPG en agua MiliQ que contenía 1,6, 0,16 y 0,016 CPG/ml. Subsiguientemente, se añadieron 2 ml de cada solución de PEPG a recipientes individuales que contenían 200 g de pasta de queso, y la mezcla se mezcló por agitación; la pasta de control no contenía cantidad alguna de PEPG sino únicamente MiliQ. Los recipientes se guardaron luego a 17ºC. Después de 4 semanas, el sabor de las pastas fue evaluado organolépticamente por un panel sensorial. El aumento de las concentraciones de PEPG daba como resultado un aumento claro de la intensidad de sabor de las pastas de queso. La PEPG es aparentemente útil en los procesos EMC para generar sabor de queso.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para el desarrollo de sabor en un alimento fermentado, alimento fermentado que es cerveza, salchicha, queso o un producto derivado de queso y en el cual se utiliza una carboxipeptidasa-1 (CPD-1) de *Aspergillus niger*.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la actividad de carboxipeptidasa-1 está causada al menos en un 90% por una sola enzima.

3. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la ratio de actividad de endoproteasa (PU) y la actividad de carboxipeptidasa (CPG) es menor que 0,01.

4. Uso de una carboxipeptidasa-1 de *Aspergillus niger* que tiene una ratio de actividad de endoproteasa (PU) y actividad de carboxipeptidasa (CPG) menor que 0,01 en la preparación de un alimento fermentado, alimento fermentado que es cerveza, salchicha, queso o un producto derivado de queso.

5. Uso de la reivindicación 4 en la preparación de EMC (queso modificado con enzimas).

6. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5 para generación de sabor.

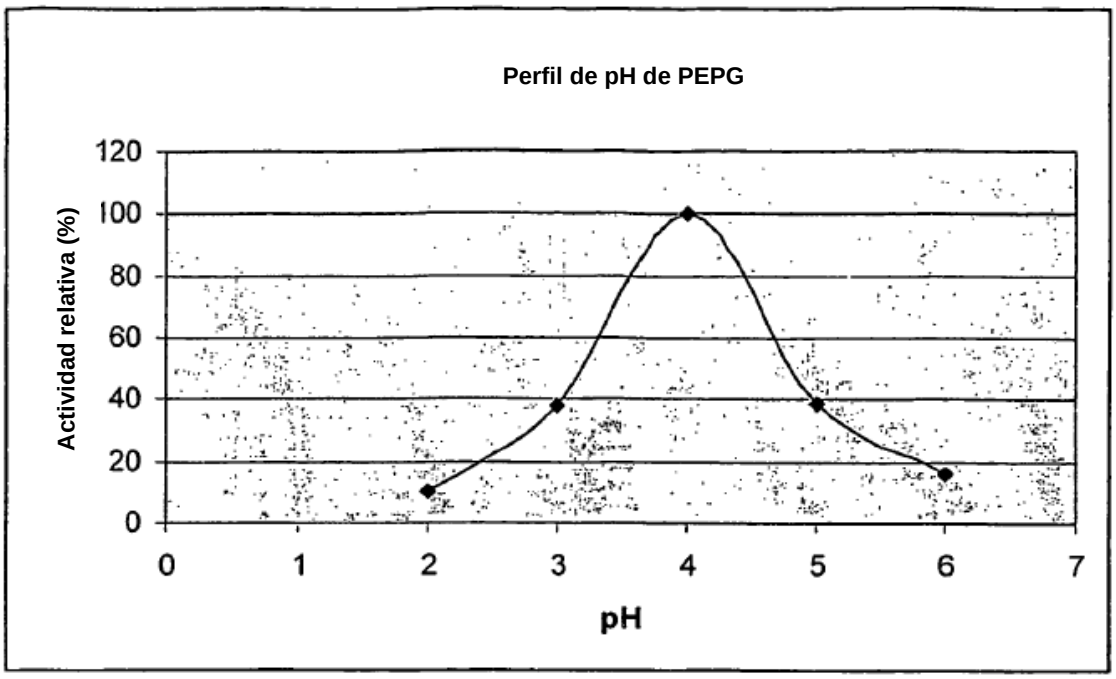
Perfil de pH de PEPG
Actividad relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
7
pH

Fig. 1